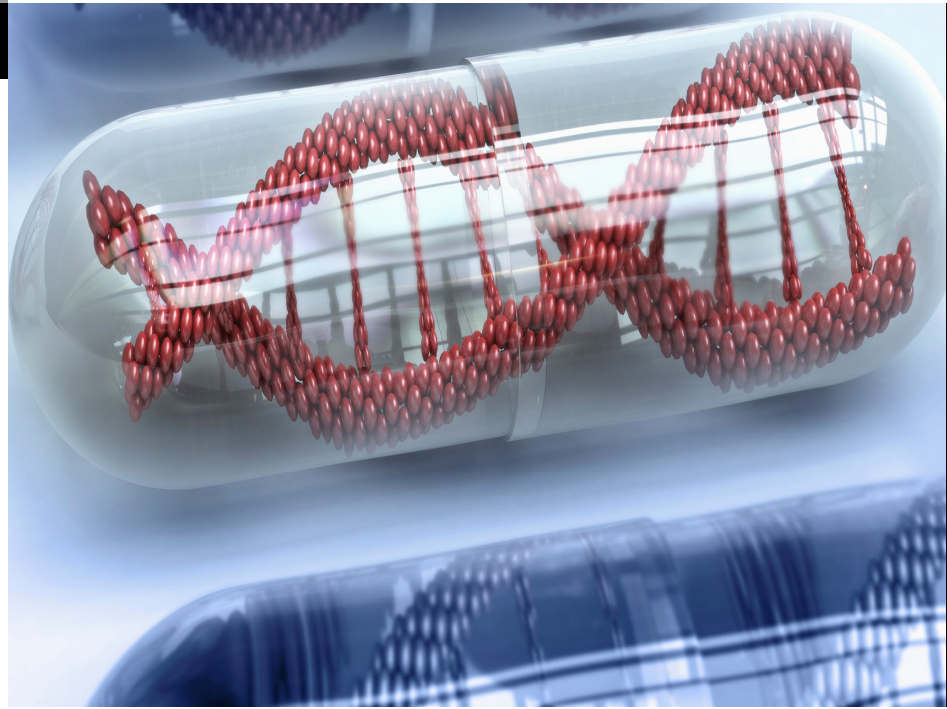


リキッドバイオプシーを対象とした 「がんゲノム医療」への試み

小野 裕介*1



Lifescience

1. はじめに

がん患者の遺伝子異常を一度で複数解析することにより、がん関連遺伝子の変異に対する最適な治療を選択する「がんゲノム医療」の推進に向けた国の体制作りがスタートしました。

全国で11カ所の「がんゲノム医療中核拠点病院」が選抜され、「連携病院」と協力しながら適切ながんゲノム医療が提供されるように、情報の共有や専門の人材育成が推進される計画です。

一方で、ゲノム異常を検査する費用は高額であるにもかかわらず、その検査結果が最適な治療薬の選択につながる割合はまだまだ低いといった問題点も残っています。

このような現状から、低コストで検査を継続できる方法、さらに、がんの治療可能性を上げる上で最も大切な「超早期診断」のための実現可能な検査方法の開発をこれからも進めることが大学等の研究機関に求められています。その中心的な課題の一つが血液などの体液を利用できる低侵襲がん診断「リキッドバイオプシー」です。

「血中遊離 DNA (cell free DNA ; cfDNA)」は、細胞外に放出され、体液中に浮遊する DNA 断片です (Crowley E et al, 2013)¹⁾ (図 1)。がん患者では健常人と比較して cfDNA がより高濃度に存在することが知られており、その一部が癌細胞に由来します。この DNA 断片に刻まれる遺伝子異常は、特異性の高い腫瘍マーカーとなることが期待されます。遺伝子異常の捕獲は、少量の体液 (血液・尿・消化液など) をもって体内に存在するがん部分の遺伝子異常へとアクセスできる可能性があります。よって「侵襲性の低さ」や「全身に存在するがんの情報を早期に取得できる可能性」という二つの面で期待が寄せられております。すなわち、cfDNA の濃度・遺伝子異常の経時的な追跡により、新規の「がん特異的マーカー」として薬剤耐性や治療効果の判定材料となることが期待されます。現在、そのようながんゲノム医療の解析の担い手として広く期待・活用されているツールが、「次世代シーケンサー (NGS)」です。しかし、「簡便性」「即時性」「感度」「コスト」の面で、NGS が広く臨床の場で活用できるようになるまでには、課題も残されています。

*1 札幌東徳洲会病院 医学研究所 臨床生体情報解析部 主任研究員

さらに我々がターゲットとしているがんの一つである膵がんの患者では腫瘍量などの理由により、早期の場合には血中 cfDNA 濃度は低く、遺伝子異常の検出は容易ではありません。我々は本研究においてデジタル PCR 技術を用いた膵

がん患者の血漿中に存在するドライバー変異（がんの発生・進展において、直接的な役割を果たす遺伝子）を高感度に検出する系の臨床実用を目指し、検討を進めています。

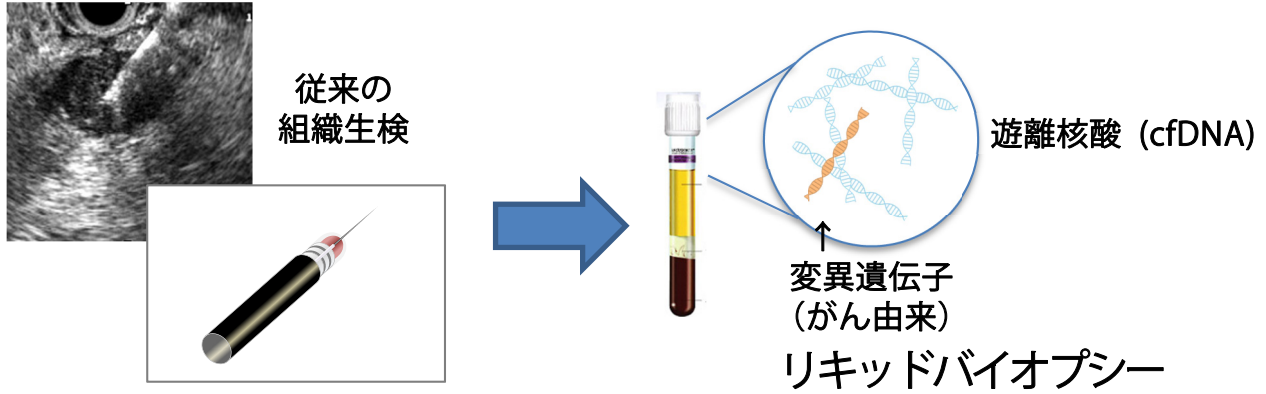


図1 リキッドバイオプシーのイメージ

2. 方法の解説・分析例

2-1 試料取得と DNA の抽出

治癒切除が可能な比較的ステージが早期の膵がん、大腸癌症例を中心として、患者本人の同意のもと血液、腫瘍組織の提供を得ました（倫理委員会承認済）。検体は当院および協力機関より集積しました。血液は、通常血漿用 EDTA 採血管、または PAXgene® ccfDNA 採血管（BD 社製；医療機器認証済）を用いました。EDTA 採血管の検体は、採血後 2 時間以内に低速、高速の 2 度の遠心分離処理を行い、細胞成分を完全に除去した上で血漿 cfDNA を精製しました。PAXgene® ccfDNA 採血管にて採取した血液は、常温で 7 日間の核酸安定保存が可能であり、精製直前に低速遠心による分離を行うことで血漿を回収しました。血漿 cfDNA の精製には、市販キットを用いました。

極微量のがん細胞由来である変異 DNA を捕捉するためには DNA の QC が重要となります。抽出後すぐに Qubit™ 2.0

フルオロメーター（Thermo Fisher Scientific 社）による核酸濃度の定量を行いました。さらに DNA の断片化パターンの解析を試みましたがアガロースゲル電気泳動では感度が低く、マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA™（島津製作所）を用いて DNA サイズ分布を計測することで、cfDNA としての品質データを集積しました（図 2）。

これまでに、少なくとも進行癌患者では、1) 健常人に比較して血漿遊離 DNA 濃度が高濃度である、2) 血漿遊離 DNA のサイズ分布が健常人でみられる 85~230 bp の他、240~400 bp の範囲にピークを認める、3) 原発巣で確認された体細胞変異がデジタル PCR を用いることで血漿遊離 DNA でも検出が可能（野生型に対し 0.1% 程度の検出感度）である、ということを確認しました。

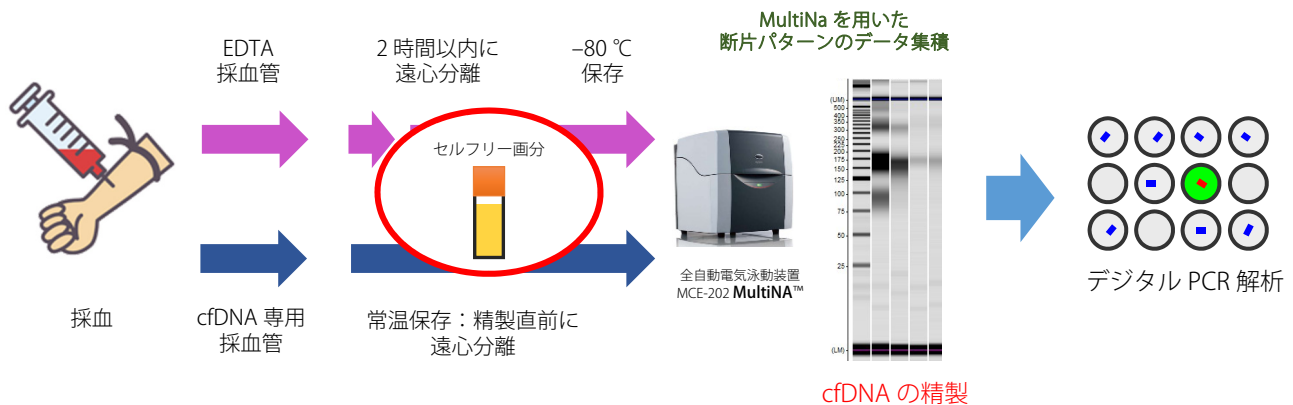


図2 リキッドバイオプシーの流れ

2-2 デジタル PCR による変異遺伝子の検出

リアルタイム定量 PCR は、蛍光色素を用いて PCR 増幅の増幅率に基づいた鋳型 DNA の量を相対的に定量する技術です。この技術はあくまで、濃度既知の標準品との比較が必要です。また、PCR 反応の頻度の問題から存在率が数%以下である希な変異の検出は困難であるとされています。それに対し、デジタル PCR (以下 dPCR) は、反応液を約 20,000 個の油滴に細分化し、鋳型を閉じ込めた状態で PCR による検出反応を行います。よって、各油滴内において低頻度のターゲット遺伝子でも PCR 反応によって増幅、検出され、非常に高い精度と感度により濃度の絶対定量が可能となります。培養細胞の DNA を用いて KRAS 遺伝子のホットスポットであるコドン 12、13 変異 (G12D、G13D) の dPCR による検出を試みた結果、下図に示すように癌細胞由来のゲノムを封入したサンプルにおいて G12D、G13D 変異がそれぞれ検出されました (点変異検出の検出下限感度は最大 0.01-0.05%) (図 3)。

dPCR は遺伝子の存在コピー数の絶対定量が可能ですが、鋳型が血漿検体からの DNA のような微量である場合、変異の検出効率は必ずしも良好ではありませんでした。早期癌診断に応用するにはさらに低濃度の cfDNA を試料とすることとなります。ピペット操作によるターゲットのロス、またウェルや流路系への吸着など、微量な DNA の変異を検出する際に生じる問題の一つが「サブサンプリング問題」です。これらは、測定データのバラつきや非検出の大きな原因である

と考えられています。我々は cfDNA を独自設計したプライマーセットで dPCR により数サイクル増幅 (pre-amplification) を行い、検出系に持ち込むことで、サブサンプリング問題を高率で回避することに成功しました (Ono.Y, et al 2017)²⁾ (図 4)。

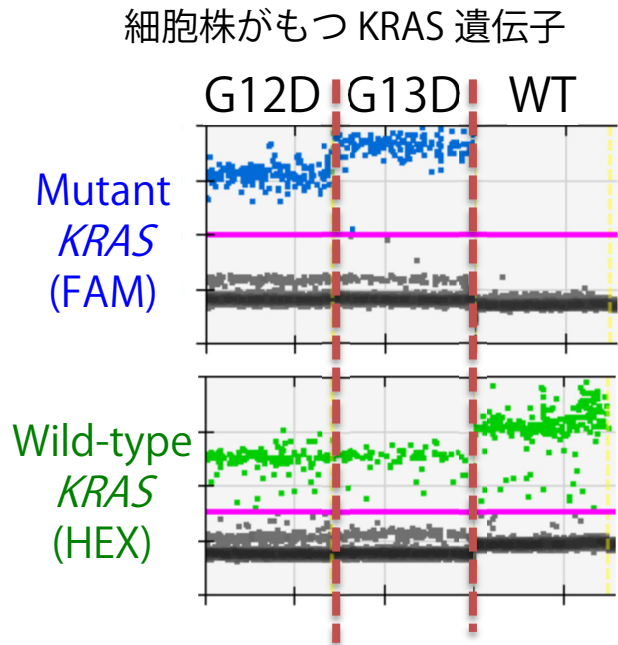


図3 デジタル PCR の定量結果

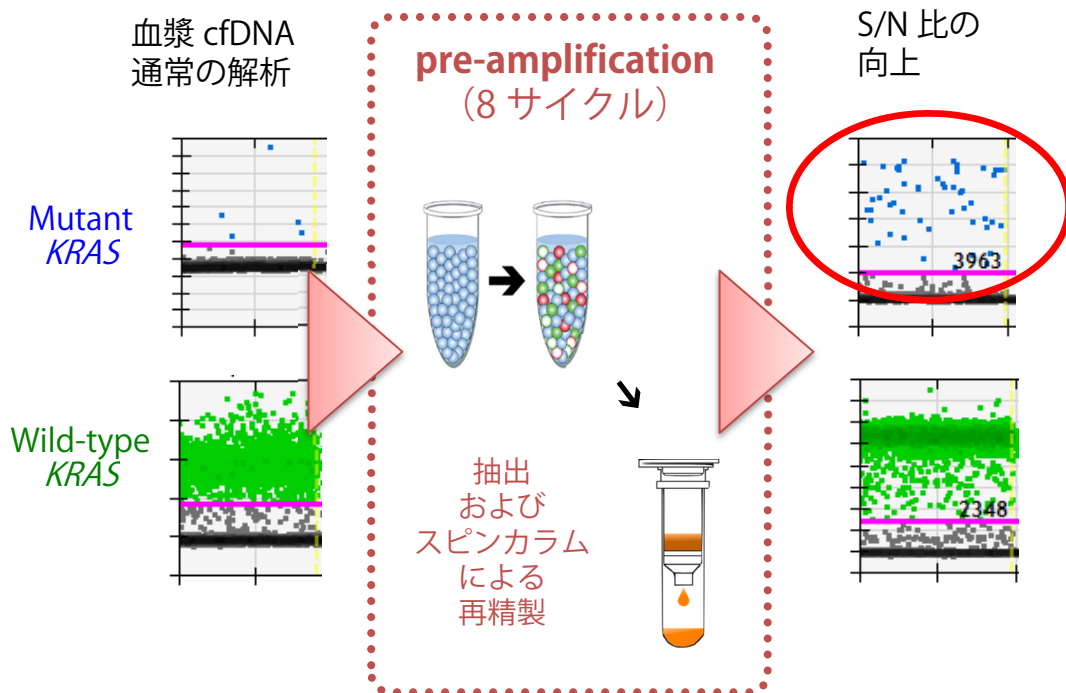


図4 デジタル PCR の改善

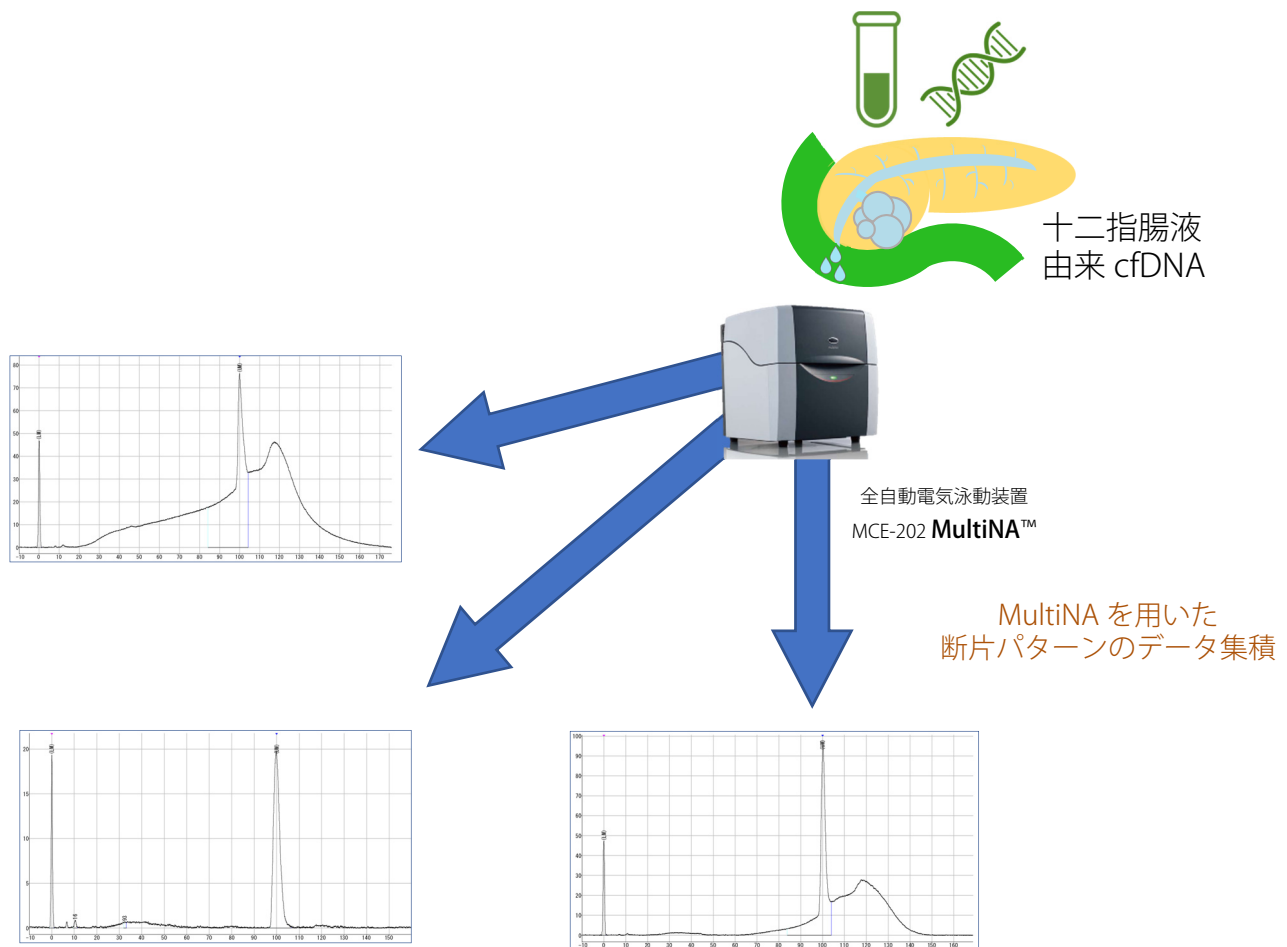
2-3 消化液を用いたリキッドバイオプシーの試み

我々は、血漿 DNA に関しては多施設共同臨床研究を主導するなど、リキッドバイオプシーの経験値を高めてきました。これまでに、約 900 検体の試料を集積し、日本癌学会等で初期成績を発表しました。

一方で、特に膵がんにおいては、変異 cfDNA の検出が確実といえる段階まで、いまだ到達していません。存在診断をより確実に実施する具体策の一つとして、腫瘍由来 DNA を病変近傍から高い濃度で得る工夫について検討を進めています。その一例が膵臓より直接分泌される消化液から遊離核酸を捉える試みです。我々は現在そのターゲットとして、十二指腸液由来の cfDNA の取得と遺伝子異常の解析について検討を行ってきました。しかし、十二指腸液は血液とは異なり粘度が高いため、サンプルとして血漿を用いた時と同じ前処理を行うと、cfDNA 精製において核酸の濃度と純度が低いという問題が起きました。現在、保存液と精製方法の両方について改良を行っています。この十二指腸液由来 cfDNA の品質管理においても MultiNA を活用しています。確認されたゲノム DNA 断片のパターンは血漿由来の cfDNA と比較すると検体により様々であることが確認されました (図 5)。

2-4 次世代シーケンス解析のライブラリ調製確認

手術可能な患者検体から得られた cfDNA は、切除組織における病変部に存在する遺伝子変異とその変異の照合を行いました。切除病変においてはその他にも遺伝子変異の蓄積を調べるため、独自に設計した 18 遺伝子のパネルを用いた次世代シーケンス解析 (Ion PGM™ 使用: ThermoFisher Scientific 社) を行いました。シーケンス解析に際して調製したライブラリのフラグメントパターンの確認において MultiNA を活用しました。プライマーダイマーや解析に不要なゲノム DNA の混入がある場合は波形パターンより確認できます。精度の高い次世代シーケンス解析においては、このようにライブラリの QC を行うことが大変重要と言えます。



検体によって断片パターンが異なる

図 5 消化液中の cfDNA の分析

3. まとめ、今後の展望

現在、大規模シーケンシングよりも高感度で、信頼性が高く、より短時間で労力を必要とせず、コスト効果的な検出方法として dPCR によるリキッドバイオプシーの運用に向けて研究開発を進めています。これまで我々が確立してきた系の検証を重ね、今後、先進医療の実現に向け取り組んでいく予定です。

対がん戦略としてリキッドバイオプシーによるこの「ゲノム診断」を導入することにより、生体試料から得られる核酸を用いて、種々のがんの診断・発症リスク予測を念頭においた遺伝子検査となることが期待されます。そこでは検体の品質・データの精度が極めて重要であり、検体の品質管理における MultiNA の役割は大きいと言えます。

4. 札幌東徳洲会病院 医学研究所について

当研究所は 2011 年に北海道初の民間病院付属の医学系研究組織として設立されました。2015 年に本格整備された施設は、遺伝子解析、細胞培養など大学と同等の研究が可能な 300 m² の実験室からなる設備を有しています。また文科省科研費助成事業指定研究機関として認定されており、研究者自らが現在までに多数の科研費を取得し、その資金を中心とした研究活動が進められています。研究成果の情報発信を目指し、民間病院という医療の最前線だからこそ見えてくる解決への道筋を模索しつつ医療の発展への貢献を目指しています。



札幌東徳洲会病院 医学研究所

<参考文献>

- 1) Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nature Reviews Clinical Oncology. Aug;10(8):472-84 (2013).
- 2) Ono Y, Sugitani A, Karasaki H, Ogata M, Nozaki R, Sasajima J, Yokochi T, Asahara S, Koizumi K, Ando K, Hironaka K, Daito T, Mizukami Y. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving 'subsampling' issues. Molecular Oncology. Oct;11(10):1448-1458 (2017).

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA “マルチナ”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。



マイクロチップ電気泳動装置
MCE-202 “MultiNA™”

高い分析性能

MultiNAによるマイクロチップ電気泳動分析では、アガロース電気泳動分析と比べて、より優れた分離能、感度、再現性、定量性を実現します。

最大 108 検体まで全自動分析

試料と試薬をセットするだけで、あとは最大 108 検体まで自動分析できます。分析前処理と分析泳動の並列処理により 1 分析あたりの時間はわずか 80 秒です。*

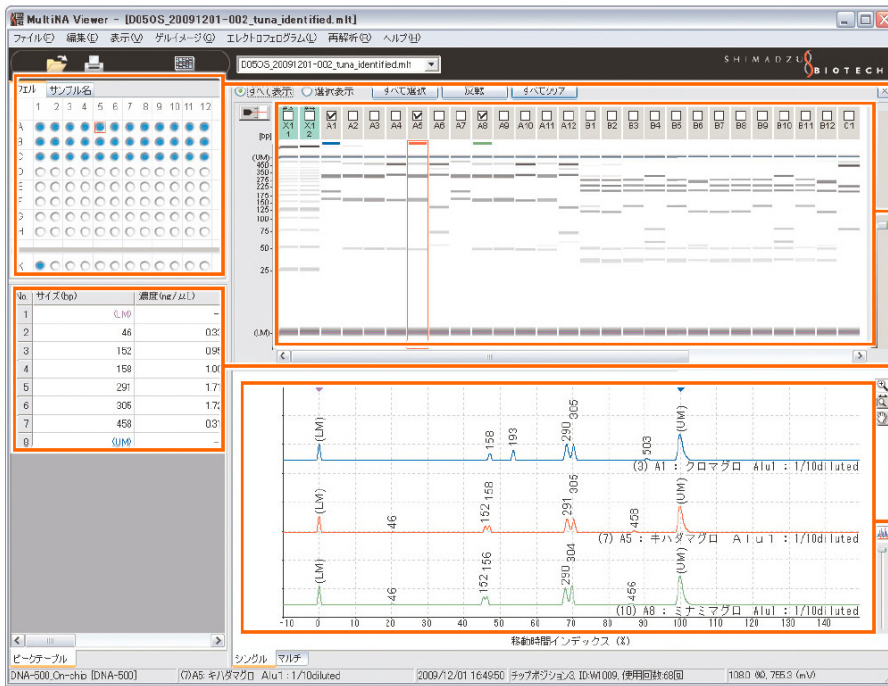
使いやすさを徹底追及

MultiNAによる分析操作は非常に簡便です。分析スケジュールを作成し、あとは試料と試薬をセットしてスタートボタンをクリックするだけです。

分析コストを低減

繰り返し利用可能な高性能マイクロチップが安価なランニングコストを実現します。

※DNA 標準分析 (DNA1000 キット/プレミックス) でマイクロチップを 4 枚使用時。ただし、初期洗浄・あと洗浄の時間及び初回分析は含まれません。



サンプルウェル表示

分析の進行状況を色で表示します。

ゲルイメージ

画像データ (JPG、BMP、TIF) として保存することができます。

ピークテーブル

サイズ推定値や濃度など CSV ファイルとして出力することができます。

エレクトロフェログラム

画像データ (JPG、BMP、TIF) として保存することができます。

MultiNA Viewer の分析結果表示

MultiNA は研究用です。医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

MultiNA は、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
PAXgene は、PreAnalytiX, GmbH の登録商標です。
Qubit および Ion PGM は、Thermo Fisher Scientific, Inc. およびその子会社の商標または登録商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。